

9/719017  
PCT/FR 99/01343

25 JUIN 1999

REC'D 07 JUL 1999

WIPO PCT

FR 99/01343



# BREVET D'INVENTION<sup>S</sup>

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE****PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **07 JUIN 1999**Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'M+Louch', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE****SIEGE**  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

| <p>DATE DE REMISE DES PIÈCES<br/><b>10 JUIN 1998</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL<br/><b>98 07474</b></p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>LY</b></p> <p>DATE DE DÉPÔT<br/><b>10/6/98</b></p>   | <p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE<br/>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p><b>RHONE-POULENC AGRO</b><br/><b>Franck TETAZ</b><br/><b>B.P. 9163</b><br/><b>69263 LYON CEDEX 09</b></p> |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
|--|---|----------------|----------------------|---------------|----------------------|--|--|--|--|
| <p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité    <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p style="text-align: center;">demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> | <p>n° du pouvoir permanent    références du correspondant    téléphone</p> <p><b>PH 98032</b>    <b>4 72 85 25 92</b></p>   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>Établissement du rapport de recherche    <input type="checkbox"/> différé    <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance    <input type="checkbox"/> oui    <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p><b>"Procédé industriel de production de protéines hétérologues chez E. Coli et souches utiles pour le procédé"</b></p> |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>3 DEMANDEUR (S)    n° SIREN    code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p><b>RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE</b></p> <p>Forme juridique</p> <p><b>S.A.</b></p>   |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>Nationalité (s)    <b>française</b></p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p><b>42 avenue Aristide Briand</b><br/><b>92160 ANTONY</b></p> <p>Pays</p> <p><b>France</b></p>  |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs    <input type="checkbox"/> oui    <input checked="" type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>   |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES    <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois    <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission</p>   |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>   |   | pays d'origine | numéro               | date de dépôt | nature de la demande |  |  |  |  |
| pays d'origine   | numéro  | date de dépôt  | nature de la demande |               |                      |  |  |  |  |
|  |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande    n°    date    n°    date</p>   |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE<br/>(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p><b>Franck TETAZ</b></p>  | <p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</p> <p><b>A. CHAPELAN</b></p>  |                |                      |               |                      |  |  |  |  |
| <p>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>   |   |                |                      |               |                      |  |  |  |  |

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

P 9807474

(N/Réf : PH 98032)

**TITRE DE L'INVENTION :**

"Procédé industriel de production de protéines hétérologues chez  
E. Coli et souches utiles pour le procédé"

**LE (S) SOUSSIGNÉ (S)**

Franck TETAZ  
RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE

**DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

PIERRARD Jérôme - 3 rue Hector Berlioz - 69009 LYON, France

FAVRE-BULLE Olivier - 113 rue Baraban - 69003 LYON, France

GUITTON Carole - 23 rue du Petit Montessuy - 69009 LYON, France

**NOTA** : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 10 Juin 1998



Franck TETAZ

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

[illegible]

## PROCEDE INDUSTRIEL DE PRODUCTION DE PROTEINES HETEROLOGUES CHEZ *E. COLI* ET SOUCHES UTILES POUR LE PROCEDE

5           La présente invention concerne un nouveau procédé industriel de production de protéines hétérologues chez *E. coli*. Si pour certaines protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée le prix de revient de leur procédé de préparation reste un facteur négligeable par rapport à la finalité de la protéine hétérologue (dans le domaine pharmaceutique notamment), le développement de la production industrielle de  
10 protéines hétérologues de moindre valeur ajoutée dans *E. coli* passe par la prise en compte de facteurs de production tels que la nécessité d'avoir une biomasse élevée et une très forte teneur en protéines hétérologues produites pour un coût le plus bas possible, lequel coût doit tenir compte de la nature du milieu, du rendement énergétique et en réactifs, et des conditions opératoires. Pour des productions  
15 industrielles avec des volumes réactionnels pouvant atteindre plusieurs dizaines de m<sup>3</sup>, on cherchera les milieux et les conditions opératoires les plus simples possibles. La présente invention consiste en la sélection d'une souche de *E. coli* appropriée pour répondre aux conditions ci-dessus, essentielles à la production industrielle économiquement satisfaisante de protéines hétérologues, indépendamment de la valeur  
20 de la protéine produite.

Les souches d'*E. coli* les plus couramment utilisées pour les travaux de biologie moléculaire dérivent de la souche K12 (Swartz, 1996, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press Washington, pp1693-1711). Des dérivés d'*E. coli* B, tels que BL21, sont également utilisés pour la  
25 production de protéines à cause de leur propriétés physiologiques. Un tableau des souches les plus couramment utilisées pour la production de protéines recombinantes est donné par Wingfield, 1997 (Current Protocols in Protein Science, Coligan *et al.* Ed. John Wiley & Sons, Inc, 5.0.1-5.0.3).

De nombreux systèmes d'expression de protéines chez des hôtes bactériens ont  
30 été décrits (Makrides, 1996, Microbiol. Rev. 60:512-538; Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7). Un système d'expression est constitué d'un promoteur, de son régulateur, d'un site de fixation du ribosome suivi d'un site de restriction permettant l'insertion du gène d'intérêt, d'une structure pouvant servir de terminateur de

transcription, éventuellement de gènes dont la coexpression augmentent la qualité de la protéine d'intérêt surexprimée et d'un ou plusieurs vecteurs permettant d'introduire dans l'hôte ces combinaisons.

Le promoteur doit présenter au moins trois caractéristiques pour être utilisé dans un procédé de production de protéines (Makrides, 1996, précité) :

- il doit être fort et conduire à l'accumulation de la protéine d'intérêt qui peut représenter 10 à 50 % des protéines totales de la cellule hôte;
- il doit pouvoir être régulé de façon pouvoir autant que possible découpler la phase de production de biomasse de la phase de production de la protéine;
- 10 - il doit être inductible (passage d'un niveau de faible activité transcriptionnelle à un niveau maximal d'activité transcriptionnelle) avec des conditions de procédé simples et bon marché.

De nombreux promoteurs ont été décrits pour l'expression chez *E. coli* (Makrides, 1996, précité; Weickert *et al.*, 1996, Current Opinions in Biotechnology 7 : 494-499). Parmi les promoteurs homologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *lac*, *trp*, *lpp*, *phoA*, *recA*, *araBAD*, *proU*, *cst-I*, *tetA*, *cadA*, *nar*, *tac*, *trc*, *lpp-lac*, *Psyn*, *cspA*. Parmi les promoteurs hétérologues utilisés pour la production de protéines chez *E. coli*, on peut citer les promoteurs *PL*, *PL-9G-50*, *PR-PL*, *T7*, *λPL-PT7*, *T3-lac*, *T5-lac*, *T4 gene 32*, *nprM-lac*, *VHb*, *Proteine A*. Un certain nombre d'inconvénients sont liés à ces promoteurs. On peut citer pour certains d'entre-eux l'utilisation de l'IPTG comme molécule inductrice, dont le prix peut représenter plus de 14 % du coût du milieu. D'autres utilisent une régulation par la température, difficile à mettre en œuvre à l'échelle d'un fermenteur industriel de 100 m<sup>3</sup>.

Les vecteurs les plus couramment utilisés pour l'expression de protéines chez *E. coli* dérivent du plasmide pBR322 (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité). Ils sont présents dans les cellules à un certain nombre de copies, déterminé par l'interaction de deux ARN codés par le plasmide, RNAI et RNAII (Polisky, 1988, Cell 55 : 929-932). L'interaction de l'ARNI avec l'ARNII inhibe la maturation de l'ARNII en une forme nécessaire à l'initiation de la réplication du plasmide. Cette interaction est modulée par la protéine ROP dont le gène est présent sur pBR322 mais pas sur certains dérivés tels que les plasmides de type pUC (Lin-Chao et Cohen, 1991, Cell 65 : 1233-1242). En matière de régulation du nombre de copies du plasmide d'expression chez *E. coli*, plusieurs stratégies sont citées (Swartz, 1996, précité; Makrides, 1996, précité).

On retiendra notamment qu'un fort nombre de copies de plasmide d'expression conduit à un niveau élevé d'ARN messagers de la protéine désirée, mais peut être pénalisant pour le métabolisme de la souche hôte (Bailey, 1993, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 48 : 29-52).

5 La stabilité des plasmides d'expression est un critère important d'autant plus que les fermentations industrielles tendent à ne pas utiliser d'antibiotiques dans les fermenteurs. Plusieurs stratégies ont été développées pour stabiliser les plasmides d'expression dont le clonage du locus *cer* du plasmide naturel ColE1. Ce locus a été caractérisé (Leung *et al.*, 1985, DNA 4 : 351-355) et son insertion sur des plasmides  
10 multi-copies a été décrite comme ayant un effet bénéfique sur la stabilité de ces plasmides (Summers et Sherratt, 1984, Cell 36 : 1097-1103).

Si les souches et les systèmes d'expression ci-dessus permettent d'obtenir de bons rendements de production de protéines hétérologues, leur emploi reste limité à la production de protéines hétérologues à très haute valeur ajoutée pour lesquelles le prix  
15 de revient du système de production (souche bactérienne, milieu et conditions de culture, matières premières) est minime comparé à la valeur de la protéine produite. Comme exemples de telles protéines à très haute valeur ajoutée, on trouve plus particulièrement les protéines hétérologues destinées à un usage pharmaceutique comme par exemple l'hormone humaine de croissance, l'interféron humain consensus alpha, les  
20 interleukines humaines 1 $\beta$ ,  $\alpha$ 1, 2, l'interféron leucocytaire humain, l'hormone parathyroïdique humaine, l'insuline humaine, l'albumine sérique humaine, la Proapolipoprotéine humaine A-1 (Lee, 1996, Trends in Biotechnol. 14:98-105 ; Latta *et al.*, 1987, Bio/Technology 5 :1309-1313).

Toutefois, pour la production d'intermédiaire chimique de masse (Lee, 1997, Nature Biotech. 15:17-18) ou pour la production d'enzymes à usage industriel,  
25 notamment des catalyseurs nécessaires à la production de composés chimiques, le prix de revient du système de production devient un facteur dominant à prendre en considération pour évaluer l'intérêt technique du dit système.

Pour la production de protéines hétérologues dans des bactéries, la productivité  
30 du système de culture employé peut être significativement augmentée en utilisant des stratégies de culture à haute densité cellulaire (S. Makrides, 1996, précité; Wingfield, 1997, précité). Parmi celles-ci se trouve la stratégie de fed-batch (Jung *et al.*, 1988, Ann. Inst. Pasteur /Micrbiol. 139 : 129-146 ; Kleman *et al.*, 1996, Appl. Environ. Microbiol.

62 : 3502-3507 ; Lee, 1996, précité ; Bauer et White, 1976, *Biotechnol. Bioeng.* 18 : 839-846 ). Cette stratégie, combinée à l'utilisation d'un promoteur *P<sub>trp</sub>*, a permis d'atteindre des productivités importantes : 55 g de poids sec par litre et 2,2 g de protéine hétérologue par litre (Jung *et al.*, 1988, précité). Il est fait état de productions en routine  
 5 de 35 à 50 g de poids sec par litre (Wingfield, 1997, précité).

Cependant, les souches et systèmes ci-dessus ne permettent pas d'obtenir des densités de culture suffisantes pour la production industrielle de protéines hétérologues dont la valeur (prix de revient) doit être négligeable au regard de leur finalité (notamment pour la préparation de catalyseurs biologiques).

10 La présente invention réside dans la sélection d'une souche de *E. coli* particulière, appropriée pour la production industrielle de protéines hétérologues. La souche utile pour le procédé selon l'invention est une souche *E. coli* W, plus particulièrement la souche W référencée à l'ATCC sous le numéro 9637.

Cette souche W (ATCC 9637), est bien connue et décrite dans de nombreuses  
 15 publications (Davies & Mingioli, 1950, *J. Bact.*, 60: 17-28 ; Doy et Brown, 1965, *Biochim. Biophys. Acta*, 104: 377-389 ; Brown et Doy, 1966, *Biochim. Biophys. Acta*, 118: 157-172 ; Wilson & Holden, 1969, *J. Biol. Chem.*, 244: 2737-2742 ; Wilson & Holden, 1969, *J. Biol. Chem.*, 244: 2743-2749 ; White, 1976, *J. Gen. Microbiol.*, 96: 51-62 ; Shaw & Duncombe, 1963, *Analyt.* 88: 694-701 ; *Br. Pharmacopoeia*, 1993, 2: A164-A169 ; Huang *et al.*, US 3,088,880; Hamsher *et al.*, US 3,905,868; Takahashi *et al.*, US 3,945,888; Huang *et al.*, US 3,239,427; Burkholder, 1951, *Science*, 114: 459-460 ; Prieto *et al.*, 1996, *J. Bact.*, 178: 11-120 ; Lee 1996, précité; Lee & Chang, 1995, *Can. J. Microbiol.* 41: 207-215; Lee et al., 1994, *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 1337-1347 ; Lee & Chang, 1993, *Biotechnology Letters*, 15: 971-974; Bauer et White, 1976, précité;  
 25 Bauer et Shiloach, 1974, *Biotechnol. Bioeng.* 16: 933-941 ; Gleiser et Bauer, 1981, *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 1015-1021 ; Lee et Chang, 1995, *Advances in Biochem. Engine./Biotech.* 52 : 27-58). La souche W (ATCC9637) a ainsi été utilisée pour la production d'acide 3-polyhydroxybutyrique (PHA) après introduction d'un plasmide portant l'opéron d'*Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA (Lee et Chang, 1993, précité; Lee et Chang, 1995, précité ; Lee et al., 1994).  
 30

La souche W a aussi été utilisée en cultures à haute densité cellulaire (Bauer et White, 1976, précité; Bauer et Shiloach, 1974, précité ; Gleiser et Bauer, 1981, précité ;

Lee et Chang, 1993, précité ; Lee et al., 1997, *Biotechnology Techniques* 11 : 59-62 ). Des biomasses de 125 g de poids sec par litre ont ainsi pu être obtenues (Lee et Chang, 1993, précité) en utilisant du saccharose comme source carbonée.

Toutefois, cette souche n'a jamais été décrite pour la production de protéines recombinantes. En outre, en combinant un plasmide portant l'opéron *d'Alcaligenes eutrophus* codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PHA et une stratégie de culture à haute densité cellulaire de la souche W recombinante correspondante, Lee et Chang (1993, précité) ont obtenu de moins bonnes productivité de PHA qu'avec une souche XL1-Blue dérivée de la souche K12 (Lee et Chang, 1995, précité ; Lee, 1996, précité).

La présente invention concerne donc un procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E coli*, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries *E coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W. Plus préférentiellement la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche W est un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.

Par procédé industriel, on entend selon l'invention tout procédé dont le volume de culture des bactéries est supérieur au volume de culture usuel employé dans les laboratoires de recherche. De manière générale, on entend par procédé industriel tout procédé pour lequel le volume de culture est supérieur à 2 litres, de préférence supérieur ou égal à 10 litres, plus préférentiellement supérieur ou égal à 20 litres, encore plus préférentiellement supérieur ou égal à 50 litres. Le procédé selon l'invention est particulièrement approprié pour des volumes de culture de plusieurs dizaine de m<sup>3</sup>. jusqu'à plus de 100 m<sup>3</sup>.

Le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites. Plusieurs types de milieux (définis, complexes et semi-définis) peuvent être utilisés pour la culture à haute densité cellulaire (Lee, 1996, précité). Si les milieux connus de l'état de la technique et en particulier les milieux semi-définis permettent de cumuler une bonne reproductibilité de la composition du milieu et une bonne

productivité de la culture (Lee, 1996, précité) le développement d'un tel milieu requiert toutefois une optimisation empirique pour la prise en compte des contraintes économiques énoncées auparavant (Lee, 1996, précité).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend du saccharose comme principale source de carbone. Par principale source de carbone, on entend selon l'invention que le saccharose représente au moins 50 % en poids du poids total des sources de carbone du milieu de culture, plus préférentiellement au moins 75 % en poids, encore plus préférentiellement au moins 85 % en poids. Selon un mode plus préférentiel de réalisation de l'invention, le milieu de culture ne comprend substantiellement que du saccharose comme source de carbone. Il est entendu que pour le procédé selon l'invention, le milieu de culture peut comprendre des additifs appropriés de manière à augmenter le rendement global de l'invention. Ces additifs peuvent avoir comme fonction annexe de se comporter comme source de carbone à la culture des bactéries. Toutefois, ces additifs ne seront pas considérés comme source de carbone au sens de la présente invention si les bactéries *E coli* W employées dans le procédé selon l'invention ne peuvent croître sur lesdits additifs comme seule source de carbone.

De manière avantageuse, la quantité de saccharose dans le milieu de culture du procédé selon l'invention est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture (avant l'ensemencement), de préférence entre 0,5 et 200 g/l. Il est entendu que le saccharose constituant la principale source de carbone du milieu selon l'invention, la quantité de saccharose ira diminuant au cours du procédé. En général, en fin de réaction la quantité de saccharose dans le milieu de culture en fin de réaction est comprise entre 0 et 10 g/l.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le milieu de culture approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire. Cette source d'azote organique complémentaire peut être constituée par toutes les sources d'azote organique connues de l'homme du métier. De préférence, la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques. Ces extraits protéiques ont plus préférentiellement la composition suivante : (en g acides aminés pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2.5 et Lysine entre 7 et 4. Les peptones ou protéines de viande ou de pomme de terre répondent à un tel profil et sont particulièrement préférées pour le procédé selon l'invention, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.

Par système d'expression de protéines hétérologues approprié, on entend selon l'invention tout système d'expression comprenant des éléments de régulation appropriés pour l'expression de protéines hétérologues dans *E. coli* W. Ces éléments de régulation comprennent notamment les promoteurs, les sites de fixation aux ribosomes, les  
 5 terminateurs de transcription.

De manière avantageuse, le système d'expression comprend un promoteur *P<sub>trp</sub>*. Le promoteur *P<sub>trp</sub>* a été utilisé dans plusieurs exemples (Demande EP 0 198 745 ; Demande CIP N° 08/194,588 ; Demande WO 97/04083 ; Latta *et al.*, 1987, Bio/Technology 5 : 1309-1314 ; Denèfle *et al.*, 1987, Gene 56 : 61-70). En particulier,  
 10 Latta *et al.* (1990, DNA Cell. Biol. 9 : 129-137) ont conduit une étude détaillée sur l'influence de séquences régulatrices en amont du promoteur, de séquences promotrices dupliquées en tandem et sur l'influence de la coexpression du represseur TrpR. Leur construction de référence, pXL534, a servi de base à la construction de pXL642 (Demande CIP N° 08/194,588 ) utilisée dans les exemples qui illustrent la présente  
 15 invention. De manière préférentielle, le promoteur *P<sub>trp</sub>* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

Selon un mode de réalisation de l'invention, pour améliorer le niveau d'expression de la protéine hétérologue, on effectue une coexpression des chaperons moléculaires d'*E. coli* GroESL (revue par Makrides, 1996, précité). L'augmentation de  
 20 la concentration intracellulaire des protéines GroESL permet en effet d'assister le repliement de la protéine recombinante et améliore ainsi le taux de protéine active (Weicker *et al.*, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7 : 494-499). Les gènes dont la coexpression favorise l'expression de la protéine hétérologue selon l'invention, et sa qualité , sont compris dans le système d'expression selon l'invention.

Par protéine hétérologue, on entend selon l'invention toute protéine produite par  
 25 le procédé selon l'invention qui ne se trouve pas naturellement dans *E. coli* W, dans le système d'expression approprié selon l'invention. Il peut s'agir d'une protéine d'origine non bactérienne, par exemple d'origine animale, notamment humaine ou végétale, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne non produite naturellement par  
 30 *E. coli* W, ou encore d'une protéine d'origine bactérienne produite naturellement par une autre bactérie que *E. coli* W ou bien encore d'une protéine produite naturellement par *E. coli* W, dont l'expression est contrôlée par des éléments de régulation distincts de

ceux du système d'expression selon l'invention, ou enfin d'une protéine dérivant des précédentes après modifications de certains éléments de sa structure primaire.

Bien entendu, le procédé selon l'invention s'applique à toute protéine d'intérêt dont la production nécessite une forte accumulation de protéines, avant soit de les extraire et de les purifier, totalement ou en partie, soit de les employer en mélange avec la biomasse qui aura permis de les produire. C'est le cas par exemple d'enzymes utiles pour la biocatalyse de réactions chimiques, qui peuvent être employés sans opération préalable d'isolement et de purification ou aussi d'enzymes qui sont utilisées dans la bactérie hôte en cours de croissance pour la biotransformation de composés chimiques.

De manière avantageuse, la protéine hétérologue est une enzyme, produite en quantités industrielles pour un usage ultérieur comme catalyseur de réactions chimiques. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme est une nitrilase, avantageusement une nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* (ATCC8750) décrite dans la demande de brevet WO 98/18941 ou une nitrilase de *Comamonas testosteroni* sp. décrite dans la demande CIP n°08/194,588, ou une amidase telle que celles décrites dans les demandes WO 97/04083, EP 433 117, EP 488 916, ou encore une hydroxyphenylpyruvate dioxygénase décrite dans la demande WO 96/38567.

La présente invention concerne également une souche *E. coli* W telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P<sub>trp</sub>* défini ci-dessus.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Les figures 1 à 3 en annexe représentent des cartes de plasmides employés dans les différents exemples.

La figure 1 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT41. Les sites entre parenthèse sont des sites qui ont été éliminés lors des clonages. *P<sub>trp</sub>* : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; *TrrnB* : terminateurs de transcription ; fin ROP : fin du gène codant pour la protéine ROP (Chambers et al., 1988, Gene 68 : 139-149) ; ORI : origine de répllication ; RNAI/II : ARN impliqués dans la répllication (Chambers et al., précité); Tc : gène de résistance à la tétracycline.

La figure 2 reorésente l carte du plasmide pRPA-BCAT127. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. *P<sub>trp</sub>* : promoteur tryptophane ; nitB : gène de la nitrilase ; *TrrnB* : terminateurs de transcription; ORI : origine de répllication ;

RNAI\*/II : ARN mutés impliqués dans la réplication; Cm : gène de résistance au chloramphenicol ; cer : locus cer .

La figure 3 représente la carte du plasmide pRPA-BCAT103. Les sites entre parenthèse ont été éliminés lors des clonages. Sm/Sp : gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine, parABCDE : locus par (Roberts et Helinski, 1992, J. Bacteriol. 174 : 8119-8132) ; rep, mob, D20 et ori : régions intervenant dans la réplication et le transfert du plasmide (Scholtz et al., 1989, Gene 75 : 271-288 ; Frey et al., 1992, Gene 113 : 101-106).

Les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art et décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York), Maniatis *et al.*, 1982, (Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc).

#### Exemple 1 : Construction des plasmides d'expression pBCAT29 et pBCAT41.

Le fragment de 1.27 kb contenant le promoteur *P<sub>trp</sub>*, le site de fixation du ribosome du gène cII du phage  $\lambda$  (RBS<sub>cII</sub>) et le gène de la nitrilase d'*Alcaligenes faecalis* ATCC8750 (*nitB*) a été extrait du plasmide pRPA6BCAT6 (Demande FR 96/13077) à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et XbaI pour être cloné dans le vecteur pXL642 (décrit dans la demande CIP N°08/194,588) ouvert par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT15 a été ouvert par les enzymes StuI et BsmI et le fragment de 4,3 kb a été ligaturé avec le fragment StuI-BsmI de 136 bp purifié de pRPA-BCAT4 (Demande FR 96/13077) pour conduire au plasmide pRPA-BCAT19. Le séquençage partiel de pRPA-BCAT19 a confirmé le remplacement du codon du résidu Asp279 de la nitrilase par le codon d'un résidu Asn279. Le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI de pRPA-BCAT19 contenant la fusion *P<sub>trp</sub> : RBS<sub>cII</sub> : nitB* a été ensuite cloné dans le vecteur pRPA-BCAT28 ouvert par les mêmes enzymes pour conduire au plasmide pRPA-BCAT29 de 6,2 kb. Le vecteur pRPA-BCAT28 a été obtenu en ligaturant le fragment de 3,9 kb SspI-ScaI de pXL642 (demande CIP N°08/194,588) avec le fragment de 2,1 kb SmaI de pHP45 $\Omega$ Tc (Fellay *et al.*, 1987, Gene 52 : 147-154) afin de remplacer le marqueur de résistance à

l'ampicilline par le marqueur de resistance à la tétracycline. En détruisant le site NdeI proche de l'origine de réplication du plasmide pRPA-BCAT29 par digestion partielle NdeI et action de la Polymérase I d'*E. coli* (Fragment de Klenow), le plasmide pRPA-BCAT41 a été obtenu dont une carte est représentée sur la figure 1. La séquence de la cassette d'expression est représentée par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2).

**Exemple 2 : Expression de la nitrilase d' *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* K12, BL21, W en « batch ».**

Les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035 (Levy-Schill *et al.*, 1995, Gene 161 : 15-20) ont été introduits dans les souches d'*E. coli* DH5 $\alpha$  (CLONECH, Référence produit C1021-1), BL21 (Novagen, référence produit 69386-1) et W (ATCC9637) par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 5 de la demande FR 96/13077 en réduisant le temps de préculture à 8 heures et en fixant le temps d'expression à 16 heures. Les biomasses après expression ont été estimées d'après la densité optique des cultures lue à 660 nm (DO660) en utilisant la relation suivante : biomasse en gramme de poids sec par litre de culture = DO660 x 0.35. Les mesures d'activité nitrilasique des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande FR 96/13077. Pour chaque souche, deux clones ont été analysés et pour chaque clone, l'expérience a été répétée. Le tableau 1 contient pour chaque souche la moyenne des données obtenues dans les quatre expériences.

**Tableau 1 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT29 et pXL2035**

| SOUCHES      | BIOMASSE (g/l) | ACTIVITE (U) | PRODUCTIVITE (P) |
|--------------|----------------|--------------|------------------|
| DH5 $\alpha$ | 0,15           | 10,4         | 1,6              |
| BL21         | 0,37           | 6,3          | 2,4              |
| W            | 0,65           | 7,0          | 4,5              |

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la nitrilase NitB.

### Exemple 3 : Construction de pBCAT43.

Le gène de la polyamide hydrolase de *Comamonas acidovorans* N12 décrit dans la demande WO 97/04083 (*pamII*) a été cloné dans le vecteur pBCAT41. En introduisant dans les amorces de PCR les sites de restriction EcoRI et NcoI en position 5' du gène et XbaI en position 3', le gène de cette polyamide hydrolase a été amplifié par PCR sous la forme d'un fragment d'ADN de 1,26 kb. Ce fragment a ensuite été traité successivement par l'enzyme EcoRI et la nucléase Mung Bean. Après extraction des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. De façon similaire, le vecteur pRPA-BCAT41 a été ouvert avec l'enzyme NdeI puis traité à la nucléase Mung Bean. Après extraction des protéines au phenol-chloroforme-alcool isoamilique, le traitement s'est poursuivi avec une digestion XbaI. Après ligature des ces deux échantillons, le plasmide pRPA-BCAT43 a été obtenu : il contient le promoteur *P<sub>trp</sub>*, le site de fixation RBS<sub>CI</sub>, séparé du codon d'initiation de la traduction du gène *pamII* par la séquence : AATACTTACACC.

### Exemple 4 : Expression de la polyamidase PamII chez *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21 et W en « batch ».

Le plasmide pRPA-BCAT43 a été introduit dans les souches d'*E. coli* DH5 $\alpha$ , L21 et W par électroporation classique. Des cultures d'expression ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus et en variant le temps d'expression de 14 à 24 heures. Les biomasses après expression ont été estimées comme dans l'exemple 2 ci-dessus. Les mesures d'activité polyamide hydrolase des cultures ont été réalisées comme décrit dans la demande WO 97/04083 avec les modifications suivantes :

- les cellules ont été perméabilisées avec du toluène en resuspendant les culots cellulaire dans un tampon 100mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH8, toluène 1% de façon à avoir une concentration en cellules sèches d'environ 5 g/l ; après une vigoureuse

agitation, la suspension est incubée une heure à 4°C puis centrifugée et enfin les culots de cellules perméabilisées sont repris dans un tampon phosphate 100 mM , pH7.

- l'activité d'hydrolyse a été mesurée sur l'oligomère AB (une molécule d'acide adipique condensée à une molécule d'hexaméthylène diamine) présent à 2,5 g/l dans le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH7 et incubé à 30°C sous agitation ;
- des prélèvements de 100 microlitres sont faits à intervalles réguliers en leur ajoutant le même volume de NaOH 0,2 N ;
- les échantillons sont analysés par HPLC après dilution au dixième dans une solution d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 50 mM.

Pour chaque souche, de 1 à 24 clones ont été analysés et pour chaque clone, une à sept expériences indépendantes ont été conduites. Le tableau 2 contient pour chaque souche la moyenne des données obtenues.

**Tableau 2 : Biomasse et activités des souches hébergeant le plasmide pRPA-BCAT43**

| SOUCHES | NB CULTURES | ACTIVITE (U) | PRODUCTIVITE (P) |
|---------|-------------|--------------|------------------|
| DH5a    | 11          | 0,77         | 0,3              |
| BL21    | 3           | 1,4          | 1,8              |
| W       | 24          | 2,1          | 2,6              |

ABREVIATIONS : NB : nombre ; U : g d'AB hydrolysé par heure et par g de poids sec ; P : g d'AB hydrolysé par heure et par litre de culture

Ces données montrent que la souche d'*E. coli* W (ATCC9637) est plus performante pour exprimer la polyamidase PamII.

#### **Exemple 5 : Construction et caractérisation du plasmide pBCAT41-531.**

Le plasmide pRPA-BCAT41 a subi une étape de mutagenèse réalisée avec de l'hydroxylamine comme décrit dans Miller 1992 (Mutagenesis. A short course in bacterial genetics, « A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria », Cold Spring Harbour Laboratory Press, Unit 4, pp81-212) et Humphreys *et al.*, 1976 (Mol. Gen. Genet. 145 : 101-108). Cinq microgrammes d'ADN plasmidique

purifié sur gradient de chlorure de Césium ont été incubés 20 minutes à 80°C dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA et 0,4 M NH<sub>2</sub>OH. Après ajout d'un volume identique de tampon phosphate de sodium 50 mM pH6 contenant 0,5 mM EDTA, le mélange réactionnel a été dialysé contre un large excès de tampon Tris-HCl 10 mM pH7,5 contenant 1 mM EDTA et 100 mM NaCl. L'ADN plasmidique a ensuite été récupéré par précipitation et environ 20 ng d'ADN a été introduit par électroporation dans la souche DH5α hébergeant le plasmide pXL2035. Parmi les transformants obtenus, un clone a été sélectionné à cause d'une productivité de la culture 3 fois supérieure à celle d'une culture de la souche DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035). Le plasmide pRPA-BCAT41-531 qu'il hébergeait a été extrait et réintroduit dans un nouvel hôte DH5α hébergeant le plasmide pXL2035. Trois clones ont alors été analysés dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en les comparant à 3 clones DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035) et les résultats sont présentés dans le tableau dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** *Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531 et pXL2035*

| Souches                          | Biomasse<br>(g/l) | Activité<br>(U) | Productivité<br>(P) |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------|
| DH5α (pRPA-BCAT41, pXL2035)      | 0,21              | 12              | 2,5                 |
| DH5α (pRPA-BCAT41-531, pXL2035). | 0,63              | 12              | 7,5                 |

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture.

Ces résultats indiquent que l'amélioration de la productivité des cultures est corrélée à la présence du plasmide pRPA-BCAT41-531.

Le fragment de 1,27 kb EcoRI-XbaI contenant la fusion *P<sub>trp</sub> : nitB* a été extrait du plasmide pRPA-BCAT41 pour être cloné à la place de celui contenu dans pRPA-BCAT41-531. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT86 a été introduit dans la souche

DH5 $\alpha$  (pXL2035) et 3 transformants ont été étudiés dans des conditions similaires à celles décrites ci-dessus. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT86 et pXL2035

| Souches                                 | Biomasse<br>(g/l) | Activité<br>(U) | Productivité<br>(P) |
|---|-------------------|-----------------|---------------------|
| DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41, pXL2035)     | 0,20              | 13,8            | 2,7                 |
| DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT41-531, pXL2035) | 0,68              | 11,0            | 7,4                 |
| DH5 $\alpha$ (pRPA-BCAT86, pXL2035)     | 0,69              | 11,9            | 8,1                 |

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

Les résultats montrent que l'amélioration de la productivité des cultures hébergeant pRPA-BCAT41-531 n'est pas due à une amélioration de l'activité spécifique de la souche et que cette amélioration n'est pas causée par une mutation dans le fragment portant le promoteur *P<sub>trp</sub>* et le gène *nitB*.

**Exemple 6 : Caractérisation d'une mutation portée par le plasmide pBCAT41-531 responsable de l'amélioration de la productivité des cultures de souches exprimant la nitrilase.**

L'analyse de la quantité de protéine produite par les souches de l'exemple 5 par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a montré que toutes ces constructions conduisaient à des taux de synthèse de polypeptide nitrilasique comparables entre les souches décrites dans cet exemple. En revanche, des préparations d'ADN plasmidique de pRPA-BCAT41 et pRPA-BCAT41-531 réalisées à partir de quantités de biomasse équivalentes ont mis en évidence que le plasmide pRPA-BCAT41-531 est présent à plus faible nombre de copie que son parent pRPA-BCAT41. Le séquençage de la région de 994 bp de pRPA-BCAT41-531 qui s'étend depuis le site Tth1111 et qui couvre l'origine de réplication du plasmide a mis en évidence deux

différences par rapport à la séquence de la région correspondante de pBR322 (GeneBank #J01749, nom : SYNpBR322). En se référant à la numérotation donnée dans la séquence J01749 (0 est le milieu de l'unique site EcoRI), nous avons trouvé qu'une insertion d'un A avait eu lieu après la base 2319 et que le C de la position 3039 est remplacé par un T chez pRPA-BCAT41-531. La première différence est imputable à une erreur lors de l'action de la polymérase Klenow qui a servi à détruire un des sites NdeI de pRPA-BCAT29 et se situe dans une région qui n'est pas décrite comme jouant un rôle dans la réplication de pBR322 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68 : 139-149). La deuxième erreur correspond à une transition, effet caractéristique de l'hydroxylamine sur l'ADN (Drake et Baltz, 1976, Annu. Rev. Biochem. 45 : 11-37), et se situe au niveau du deuxième nucléotide de la région transcrite en ARN I impliquée dans la réplication de pBR322 (Chambers *et al.*, précité). C'est cette dernière mutation qui est responsable du plus faible nombre de copies de pRPA-BCAT41-531 dans DH5 $\alpha$  et qui est responsable de la meilleure productivité nitrilasique des cultures de la souche DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT41-531, pXL2035).

**Exemple 7 : Expression de la nitrilase de *A. faecalis* ATCC 8750 chez *E. coli* BL21 et *E. coli* W en « fed-batch » (culture semi-continue).**

Les plasmides pRPA-BCAT41-531 et pXL2035 ont été introduits par électroporation dans les souches BL21 (référence précitée) et W (ATCC9637) pour donner respectivement les souches RPA-BIOCAT594 [BL21 (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)] et RPA-BIOCAT714 [W (pRPA-BCAT41-531, pXL2035)]. Les recombinants *E. coli* BIOCAT 594 et *E. coli* BIOCAT 714 ont été cultivés dans des fermenteurs de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

| Composé   | Concentration en g/l |
|---|----------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 8                    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 6,3                  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,75                 |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 2,5                  |
| Sulfate de fer                                  | 0,04                 |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0,05                 |

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Sulfate de manganèse      | 0,01   |
| Chlorure de Co            | 0,004  |
| Sulfate de Zn             | 0,002  |
| Molybdate de Na           | 0,002  |
| Chlorure de cuivre        | 0,002  |
| Acide borique             | 0,0005 |
| Citrique.H <sub>2</sub> O | 1,7    |
| Glucose monohydraté       | 95     |
| L-tryptophane             | 0,1    |
| Peptone de viande         | 5      |
| Extrait de levure         | 3      |

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/ l ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

Après 24 heures de fermentation, le milieu est récupéré, centrifugé et le poids sec est estimé en g/ l. L'activité enzymatique est mesurée suivant un protocole donné dans le brevet WO96/09403. Elle est exprimée en kilos de 3-hydroxybutanoate d'ammonium formées par heure et par kilo de cellules sèches.

| Souche            | Biomasse finale | Activité finale | Rendement sur glucose |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| BIOCAT 594 (BL21) | 27 g/ l         | 13              | 23%                   |
| BIOCAT 714 (W)    | 40 g/ l         | 17              | 40%                   |

Il apparaît clairement dans cet exemple, que la nitrilase s'exprime beaucoup mieux dans *E. coli* W que dans *E. coli* BL21 et que le recombinant *E. coli* W BIOCAT 714 pousse beaucoup mieux que le recombinant *E. coli* BL21 BIOCAT 594.

**Exemple 8 : Influence de la source d'azote organique d'origine animale.**

La souche E. coli W BIOCAT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

5

| Composé              | Concentration dans le milieu en g/ l |
|----------------------|--------------------------------------|
| $K_2HPO_4$           | 8                                    |
| $(NH_4)_2SO_4$       | 0,75                                 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2,5                                  |
| Sulfate de fer       | 0,04                                 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,04                                 |
| Sulfate de manganèse | 0,026                                |
| Chlorure de Co       | 0,004                                |
| Sulfate de Zn        | 0,013                                |
| Molybdate de Na      | 0,001                                |
| Chlorure de cuivre   | 0,001                                |
| Acide borique        | 0,00025                              |
| $AlCl_3$             | 0,00125                              |
| Citrique. $H_2O$     | 1,7                                  |
| Glucose monohydraté  | 95                                   |
| L-tryptophane        | 0,1                                  |
| Extrait de levure    | 3                                    |

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. Le glucose est introduit au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommé, il est introduit de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : glucose 700 g/ l ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose/h. l de milieu.

10

A ce milieu, on ajoute une source d'azote organique d'origine animale.

| Source d'azote organique d'origine animale | Biomasse finale | Activité finale | Rendement sur glucose |
|--|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Aucune                                     | 30              | 2               | 40%                   |
| 2,5 g/l de peptone de viande               | 33              | 12              | 40%                   |
| 5 g/l de peptone de viande                 | 40              | 25              | 45%                   |
| 5 g/l de caséine                           | 35              | 20              | 43%                   |

L'utilisation de concentration croissante en azote organique d'origine animale augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

5

#### **Exemple 9 : Influence de l'azote organique d'origine végétale.**

Les conditions de culture sont identiques à celles de l'exemple 8. Dans cet exemple, on ajoute de l'azote organique d'origine végétal.

| Source d'azote organique d'origine végétale   | Biomasse finale | Activité finale | Rendement sur glucose |
|---|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Aucune  | 30              | 2               | 40%                   |
| 5 g/l de peptone de soja  | 31              | 4               | 40%                   |
| 5 g/l de peptone de blé   | 32              | 5               | 40%                   |
| 7,5 g/l d'hydrolysate sodique de protéine de pomme de terre (Alburex SP ; Roquette) | 35              | 17              | 43%                   |

10

L'ajout d'azote organique végétal ne donne pas des résultats identiques suivant l'origine.

De manière surprenante, l'ajout de protéine de pomme de terre, donne d'aussi bon résultat que l'azote organique d'origine animale.

15

#### **Exemple 10 : influence de la source de carbone.**

La souche E. coli W BIOCANT 714 est cultivée dans un fermenteur de 3,5 litres contenant 2 litres de milieu dont la composition est la suivante :

| Composé                              | Concentration dans le milieu en g/ l |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Trempe de Maïs<br>LAB2218 (Roquette) | 40                                   |
| Extrait de levure                    | 3                                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 2,5                                  |

Le pH est maintenu à 7,0 par ajout d'ammoniaque. La saturation en oxygène est maintenue à 20% par ajout d'air à raison de 1 volume/ volume de milieu/ minute et par agitation. La source de carbone est introduite au début à une concentration finale de 2 g/ l. Après être totalement consommée, elle est introduite de manière continu à partir d'une solution mère dont la composition est la suivante : source de carbone 700 g/ l ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 19,6 g/ l. La vitesse d'addition est de 2,2 g de glucose ou de saccharose/h. l de milieu.

La source de carbone est variée dans cet exemple.

| Source de carbone              | Biomasse finale | Activité finale | Rendement sur carbone |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Glucose monohydraté 90 g/ l    | 38              | 11              | 45%                   |
| Sirop zéro (EUROSUCRE) 90 g/ l | 38              | 17              | 45%                   |

Dans cet exemple, on observe que l'emploi de saccharose (sirop zéro) comme source de carbone augmente de manière significative l'activité spécifique des cellules.

### Exemple 11 : Construction d'un plasmide de co-expression du régulateur TrpR

Un fragment d'ADN de 434 bp porteur du gène *trpR* et de son promoteur a été extrait du plasmide pRPG9 (Gunsalus et Yanofsky, 1980, Proc. Natl. Aca. Sci. USA 77 : 7117-7121) à l'aide des enzymes de restriction AatII et StuI. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pSL301 (Brosius, 1989, DNA 8 : 759-777) en le ligaturant au fragment d'environ 3,1 kb AatII-StuI pour donner le plasmide pRPA-BCAT30. Le gène *trpR* et son promoteur ont alors été extraits de pRPA-BCAT30 sous la forme d'un fragment d'EcoRI-NotI de 475 bp pour être cloné dans le plasmide pXL2035 à la place

d'un fragment de 240 bp EcoRI-NotI. Le plasmide résultant, pRPA-BCAT34, est donc un dérivé de pKT230 permettant l'expression des chaperons GroESL et du régulateur TrpR.

### 5 Exemple 12 : Influence de la co-expression de GroESL et de TrpR .

Le plasmide pRPA-BCAT34 a été introduit par électroporation dans les souche DH5 $\alpha$  (pRPA-BCAT29), BL21 (pRPA-BCAT29) et W (pRPA-BCAT29). Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées comme décrit dans l'exemple 2 et les résultats sont présentés dans le tableau 5.

10

*Tableau 5 : Biomasse et activités des souches hébergeant des combinaisons les plasmides pRPA-BCAT29, pXL2035 et pRPA-BCAT34*

| Combinaisons | pRPA-BCAT29 |      | pRPA-BCAT29<br>pXL2035 |     | pRPA-BCAT29<br>pRPA-BCAT34 |     |
|--------------|-------------|------|------------------------|-----|----------------------------|-----|
|              | U           | P    | U                      | P   | U                          | P   |
| DH5alpha     | 0,37        | 0,16 | 10,4                   | 1,6 | 2,0                        | 0,7 |
| BL21         | 0           | 0,0  | 6,4                    | 2,4 | 5,6                        | 2,0 |
| W            | 1,7         | 0,96 | 7,0                    | 4,5 | 8,9                        | 6,5 |

ABREVIATIONS : U : Activité, kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids

15 sec ; P : Productivité, kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

Les résultats montrent que la coexpression de GroESL permet d'augmenter la productivité des cultures quelle que soit la souche considérée en améliorant l'activité spécifique des cultures. Cet effet est corrélé avec une augmentation de la solubilité du polypeptide nitrilasique comme le montre une analyse des protéines par électrophorèse

20 telle que décrite dans la demande FR 96/13077. L'effet de la coexpression du régulateur TrpR est variable selon les souches mais permet chez W d'améliorer la productivité des cultures.

### Exemple 13 : Influence de la présence d'un locus *cer* sur pRPA-BCAT41

Le fragment de 382 bp HpaII contenant le locus *cer* du plasmide ColE1 (Leung *et al.*, 1985, DNA 4 : 351-355) a été cloné dans la forme replicative du phage M13mp7 au niveau d'un des 2 sites AccI. La construction obtenue a alors permis d'extraire avec  
 5 l'enzyme EcoRI un fragment d'environ 430 bp contenant le locus *cer* qui a été cloné dans pRPA-BCAT41 au site EcoRI, ce qui a conduit au plasmide pRPA-BCAT66. Ce plasmide a été introduit par électroporation dans la souche W hébergeant le plasmide pRPA-BCAT34. Des cultures d'expression de différentes souches ont été menées  
 10 comme décrit dans l'exemple 2 en allongeant la durée des cultures d'expression à 24 heures et en étudiant trois clones de chaque souche dans une unique expérience. Les résultats moyennés sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** *Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT66 et pRPA-BCAT34*

| Souches                         | Biomasse<br>(g/l) | Activité<br>(U) | Productivité<br>(P) |
|---------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------|
| W (pRPA-BCAT41, pRPA-BCAT 34)   | 2,1               | 6,9             | 14,5                |
| DH5α (pRPA-BCAT66, pRPA-BCAT34) | 1,8               | 10,0            | 18.0                |

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par

Ces résultats montrent que l'ajout du locus *cer* sur le plasmide d'expression de la  
 20 nitrilase conduit à améliorer la productivité des cultures.

### Exemple 14 : Construction du plasmide pRPA-BCAT127

Après élimination du site unique NdeI du plasmide pRPA-BCAT30 par digestion et formation d'extrémités franches avec de la polymérase I (Fragment de  
 25 Klenow), le gène *trpR* a été extrait de ce dernier plasmide sous la forme d'un fragment d'environ 300 bp préparé par un traitement avec l'enzyme AatII suivi de l'action de la polymérase I (Fragment de Klenow), puis, après inactivation du mélange réactionnel,

par une digestion avec l'enzyme SacII. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pRPA-BCAT66 après ouverture de celui-ci avec Tth111 suivi d'un traitement à la polymérase I (Fragment de Klenow) et, après inactivation, avec SacII. Le plasmide pRPA-BCAT82 a ainsi été obtenu. Son origine de répllication a été remplacée par celle  
 5 du plasmide pRPA-BCAT41-531 en remplaçant le fragment Bst1107I-Eam1105I d'environ 1,12 kb. La construction sélectionnée lors de ce clonage, le plasmide pRPA-BCAT99, présente un artefact qui se manifeste sous la forme d'une délétion d'un nucléotide au niveau du site Eam1105I, transformant ce site en un site unique PshAI. Le marqueur de résistance du plasmide pRPA-BCAT99 a alors été changé en clonant  
 10 entre les sites AatII et PshAI un fragment AatII-PshAI d'environ 1,07 kb préparé après amplification PCR du gène codant pour la résistance au chloramphenicol à partir de la matrice pACYC184 (New England Biolabs #401-M) en utilisant les amorces Cm1 et Cm2 dont la séquence est :

Cm1 : 5'-CCCCCGACAGCTGTCTTGCTTTCGAATTTCTGCC

15 Cm2 : 5'-TTGACGTCAGTAGCTGAACAGGAGGG

Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pRPA-BCAT123. Il a été ensuite modifié en éliminant le gène *trpR* sous la forme d'un fragment SacI-Bst1107I d'environ 0,525 kb, et refermeture du plasmide après formation d'extrémités franches avec de la polymérase Pfu (15 minutes à 75°C dans le tampon recommandé par le fournisseur Stratagène et en  
 20 présence de 0,2 mM de deoxynucléotides). Le plasmide ainsi obtenu est le plasmide pRPA-BCAT127 dont la carte est schématisée sur la figure 2.

#### **Exemple 15 : Construction des plasmides pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103 .**

25 Le plasmide pRPA-BCAT37, décrit dans la demande FR 96/13077, a été modifié en remplaçant le fragment SfiI-ScaI d'environ 3,2 kb par le fragment SfiI-ScaI d'environ 2,42 kb du plasmide RSF1010D20 (Frey *et al.*, 1992, Gene 113 :101-106). Ce fragment contient une délétion dans la partie 5' du gène codant pour la primase RepB et réduit de 6 log la fréquence de transfert du plasmide (Frey *et al.*, précité). Le  
 30 plasmide ainsi obtenu, pRPA-BCAT98, possède plusieurs avantages : la perte de ses fonctions de mobilisation le rend conforme aux règles de biosécurité industrielle tout en lui gardant ses caractéristiques de répllication chez les bactéries Gram-négatives.

Le locus *par* (Gerlitz *et al.*, 1990, J. Bacteriol 172 : 6194-6203) a ensuite été cloné sur pRPA-BCAT98 comme suit. Le fragment SphI-BamHI d'environ 2,3 kb de pGMA28 (Gerlitz *et al.*, précité) a d'abord été cloné dans le vecteur pUC18, ce qui a permis de l'extraire sous la forme d'un fragment HindIII-EcoRI pour le cloner dans le vecteur pMTL22 (Chambers *et al.*, 1988, Gene 68:139-49). Le site HindIII a ensuite été détruit par digestion HindIII et traitement à la Klenow. Un fragment d'environ 2,38 kb a alors été extrait avec les enzymes PstI et BglII pour être cloné dans le vecteur pXL2426 aux sites PstI et BamHI et conduire au vecteur pXL2572. Le vecteur pXL2426 provient du remplacement du fragment de 2,38 kb SfiI-EcoRV de pXL2391 (demande FR 96/13077) par le fragment SfiI-EcoRV de 1,47 kb de RSF1010D20. Le clonage sur le plasmide pXL2572 aux sites NdeI et BamHI d'un fragment d'environ 0,960 bp NdeI-BamHI de pRR71 (Weinstein *et al.*, 1992, J. Bacteriol. 174 : 7486-7489) a permis de reconstituer le locus *par* en entier sur le plasmide pXL2573. Ce locus a alors été extrait de pXL2573 sous la forme d'un fragment de 2,6 kb EcoRI-extremité franche (après traitement par PstI et Klenow) afin d'être cloné sur le plasmide pRPA-BCAT98 ouvert par EcoRI et SacI, cette dernière extrémité ayant été traitée par la polymérase Pfu. Le plasmide résultant a été appelé pRPA-BCAT103 et sa carte est schématisée sur la figure 3.

**Exemple 16 : Utilisation des plasmides pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103 et pRPA-BCAT127 pour l'expression de la nitrilase chez W.**

Les plasmides pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231 (demande FR 96/13077) ont été introduits dans la souche d'*E. coli* W par électroporation et des cultures d'expression ont été menées dans les conditions décrites dans l'exemple 2 en utilisant les antibiotiques suivants : Tétracycline 12 µg/ml pour pXL2231, kanamycine 50 µg/ml pour pXL2035, Streptomycine 100 µg/ml pour pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT103, Chloramphenicol 20 µg/ml pour pRPA-BCAT127. Pour chaque combinaison de plasmides, deux à trois clones ont été analysés et les résultats moyens sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Biomasse et activités des souches hébergeant les plasmides pRPA-BCAT41-531, pRPA-BCAT127, pRPA-BCAT98, pRPA-BCAT103, pXL2035 et pXL2231**

5

| Combinaison           | Biomasse<br>(g/l) | Activité<br>(U) | Productivité<br>(P) |
|-----------------------|-------------------|-----------------|---------------------|
| pBCAT127 / pXL2231    | 1,43              | 4,9             | 7                   |
| pBCAT127 / pBCAT 103  | 1,75              | 7               | 12                  |
| pBCAT127 / pBCAT98    | 1,72              | 11,2            | 19                  |
| pBCAT127 / pXL2035    | 1,70              | 7,2             | 12                  |
| pBCAT41-531 / pXL2035 | 1,36              | 5,9             | 8                   |

ABREVIATIONS : g/l : gramme de poids sec par litre de culture ; U : kg d'HMTBA formé par heure et par kg de poids sec ; P : kg d'HMTBA formé par heure et par litre de culture

10

Les combinaisons pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT98 et pRPA-BCAT127/pRPA-BCAT103 permettent une productivité au moins équivalente en utilisant des plasmides conformes aux critères de biosécurité européens.

## LISTE DE SEQUENCES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 121 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

|   |     |
|---|-----|
| GAATTCCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG  | 60  |
| TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC | 120 |
| A   | 121 |

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1793 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 123..1190

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

|   |     |
|---|-----|
| GAATTCCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC TAGTTAACTA GTACGCAGCT TGGCTGCAGG  | 60  |
| TCGACCTGCA GCCAAGCTTG GGCATACATT CAATCAATTG TTATCTAAGG AAATACTTAC | 120 |
| AT ATG CAG ACA AGA AAA ATC GTC CGG GCA GCC GCC GTA CAG GCC GCC    | 167 |
| Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala       |     |
| 1 5 10 15   |     |
| TCT CCC AAC TAC GAT CTG GCA ACG GGT GTT GAT AAA ACC ATT GAG CTG   | 215 |
| Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu   |     |
| 20 25 30  |     |
| GCT CGT CAG GCC CGC GAT GAG GGC TGT GAC CTG ATC GTG TTT GGT GAA   | 263 |
| Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu   |     |
| 35 40 45  |     |
| ACC TGG CTG CCC GGC TAT CCC TTC CAC GTC TGG CTG GGC GCA CCG GCC   | 311 |
| Thr Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala   |     |
| 50 55 60  |     |

|   |      |
|---|------|
| TGG TCG CTG AAA TAC AGT GCC CGC TAC TAT GCC AAC TCG CTC TCG CTG<br>Trp Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu<br>65 70 75        | 359  |
| GAC AGT GCA GAG TTT CAA CGC ATT GCC CAG GCC GCA CGG ACC TTG GGT<br>Asp Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly<br>80 85 90 95     | 407  |
| ATT TTC ATC GCA CTG GGT TAT AGC GAG CGC AGC GGC GGC AGC CTT TAC<br>Ile Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr<br>100 105 110     | 455  |
| CTG GGC CAA TGC CTG ATC GAC GAC AAG GGC CAG ATG CTG TGG TCG CGT<br>Leu Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Gln Met Leu Trp Ser Arg<br>115 120 125     | 503  |
| CGC AAA CTC AAA CCT ACA CAT GTT GAG CGC ACC GTG TTT GGT GAA GGT<br>Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly<br>130 135 140     | 551  |
| TAT GCC CGA GAT CTG ATT GTG TCC GAC ACC GAG CTG GGC CGC GTC GGT<br>Tyr Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly<br>145 150 155     | 599  |
| GCC CTG TGC TGC TGG GAG CAC CTG TCC CCC TTG AGC AAG TAC GCG CTG<br>Ala Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu<br>160 165 170 175 | 647  |
| TAC TCC CAG CAC GAA GCC ATT CAC ATT GCC GCC TGG CCG TCC TTT TCG<br>Tyr Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser<br>180 185 190     | 695  |
| CTG TAC AGC GAA CAG GCC CAT GCG CTC AGC GCC AAG GTG AAC ATG GCT<br>Leu Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala<br>195 200 205     | 743  |
| GCC TCG CAA ATC TAT TCG GTT GAA GGC CAG TGC TTT ACC ATC GCC GCC<br>Ala Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala<br>210 215 220     | 791  |
| AGC AGT GTC GTC ACC CAG GAG ACA CTG GAC ATG CTG GAA GTA GGT GAA<br>Ser Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu<br>225 230 235     | 839  |
| CAC AAC GCC TCC CTG CTG AAA GTG GGC GGC GGC AGT TCC ATG ATT TTT<br>His Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe<br>240 245 250 255 | 887  |
| GCG CCG GAC GGA CGC ACA TTG GCT CCC TAC CTG CCA CAC GAT GCC GAA<br>Ala Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu<br>260 265 270     | 935  |
| GGC CTG ATC ATT GCC GAT CTG AAC ATG GAA GAA ATT GCC TTC GCC AAG<br>Gly Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys<br>275 280 285     | 983  |
| GCG ATC AAC GAC CCT GTG GGC CAC TAC TCC AAA CCC GAG GCC ACC CGT<br>Ala Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg<br>290 295 300     | 1031 |

CTG GTA CTG GAC CTG GGG CAC CGT GAG CCC ATG ACT CGG GTG CAT TCC 1079  
 Leu Val Leu Asp Leu Gly His Arg Glu Pro Met Thr Arg Val His Ser  
 305 310 315

AAA AGC GTG ATC CAG GAA GAA GCT CCC GAG CCG CAC GTG CAA AGT ACG 1127  
 Lys Ser Val Ile Gln Glu Glu Ala Pro Glu Pro His Val Gln Ser Thr  
 320 325 330 335

GCT GCG CCC GTC GCC GTC AGC CAG ACT CAG GAC TCG GAT ACG CTA CTG 1175  
 Ala Ala Pro Val Ala Val Ser Gln Thr Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu  
 340 345 350

GTG CAA GAA CCG TCC TGA CCCCAAAGA TGACAAGGCC CGGGCAAAC 1223  
 Val Gln Glu Pro Ser  
 355

GTCCGGGTCT TGATTCCTTC TCGTCCCGG ATCCACTAGT TCTAGAGTCG ACCTGCAGGC 1283

ATGCAAGCTT GGGTCCCACC TGACCCCATG CCGAACTCAG AAGTGAAACG CCGTAGCGCC 1343

GATGGTAGTG TGGGGTCTCC CCATGCGAGA GTAGGGAAC TCCAGGCATC AAATAAAACG 1403

AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTCG TTTTATCTGT TGTTTGTCGG TGAACGCTCT 1463

CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CGGGAGCGGA TTTGAACGTT GCGAAGCAAC GGCCCGGAGG 1523

GTGGCGGGCA GGACGCCCGC CATAAACTGC CAGGCATCAA ATTAAGCAGA AGGCCATCCT 1583

GACGGATGGC CTTTTTGCGT TTCTACAAAC TCTTCCTGTC GTCATATCTA CAAGCCATCC 1643

CCCCACAGAT ACGGTAAACT AGCCTCGTTT TTGCATCAGG AAAGCAGCTA TGAACCACTC 1703

CTTAAACCC TGGAACACAT TTGGCATTGA TCATAATGCT CAGCACATTG TATGTGCCGA 1763

AGACGAACAA CAATTACTCA ATGCCCCGCGG 1793

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCCCCGACA GCTGTCTTGC TTTCGAATTT CTGCC

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: oligonucléotide .

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTGACGTCAG TAGCTGAACA GGAGGG

## REVENDEICATIONS

1. Procédé industriel de préparation de protéines hétérologues dans *E. coli*, dans lequel on ensemence et on cultive dans un milieu de culture approprié des bactéries  
5 *E. coli* modifiées avec un système d'expression de protéines hétérologues approprié, caractérisé en ce que la souche de *E. coli* est une souche *E. coli* W.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est la souche W déposée à l'ATCC sous le numéro 9637.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche W est  
10 un dérivé de la souche déposée à l'ATCC sous le numéro 9637 obtenu par sélection clonale ou manipulation génétique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié est un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une forte densité de biomasse et une forte teneur en protéines hétérologues produites.
- 15 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du saccharose comme principale source de carbone.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le milieu de culture ne comprend substantiellement que du saccharose comme source de carbone.
7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que la  
20 quantité de saccharose dans le milieu de culture est comprise entre 0,1 et 300 g/l en début de culture, de préférence entre 0,5 et 200 g/l.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le milieu de culture approprié comprend en outre une source d'azote organique complémentaire.
- 25 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par des extraits protéiques.
10. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que l'extrait protéique a la composition suivante : (en g acides aminés pour 100g de produit) Alanine entre 10 et 4, Aspartique entre 11 et 4, Glycine entre 22 et 2,5 et  
30 Lysine entre 7 et 4
11. Procédé selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la source d'azote organique complémentaire est constituée par les peptones ou protéines de

viande ou de pomme de terre, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le système d'expression de protéines hétérologues approprié comprend un promoteur *P<sub>trp</sub>*.

5 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le promoteur *P<sub>trp</sub>* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la protéine hétérologue est une enzyme.

10 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'enzyme est utile pour la biocatalyse de réactions chimiques.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'enzyme est une nitrilase.

15 17. Souche *E. coli* W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P<sub>trp</sub>*.

18. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que le promoteur *P<sub>trp</sub>* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

viande ou de pomme de terre, plus particulièrement les dérivés de protéines de pomme de terre.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le système d'expression de protéines hétérologues approprié comprend un promoteur *P<sub>trp</sub>*.

5 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le promoteur *P<sub>trp</sub>* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la protéine hétérologue est une enzyme.

10 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'enzyme est utile pour la biocatalyse de réactions chimiques.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'enzyme est une nitrilase.

15 17. Souche *E. coli* W, caractérisée en ce qu'elle comprend un système d'expression de protéines hétérologues dont le promoteur est le promoteur *P<sub>trp</sub>*.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que le promoteur *P<sub>trp</sub>* comprend la séquence d'acides nucléiques représentée par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

1/2

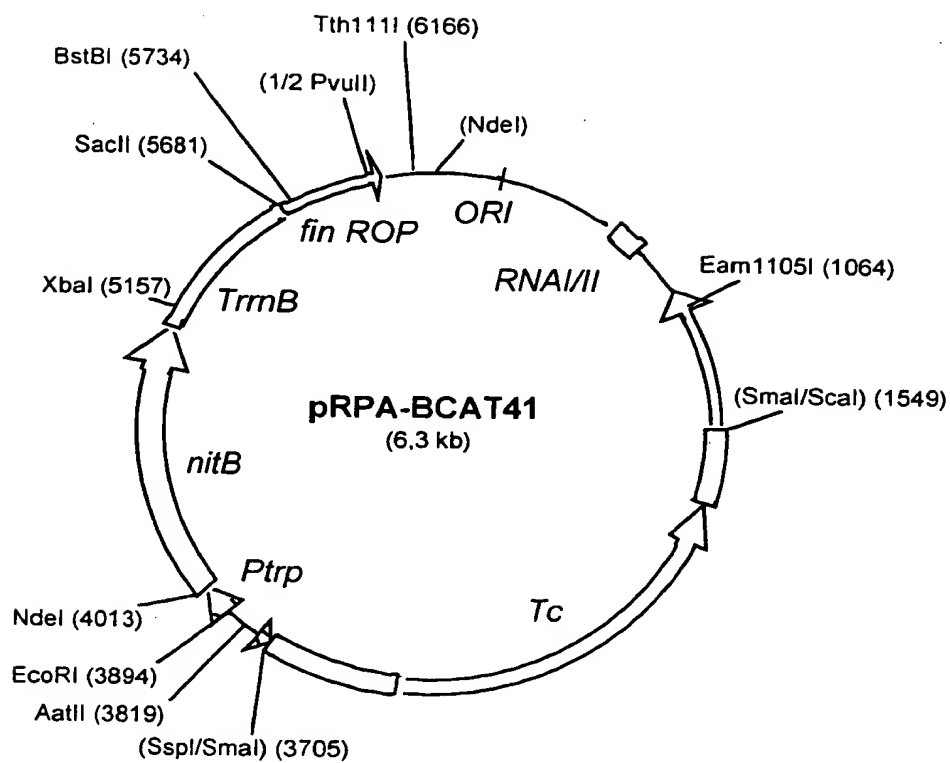


Fig. 1

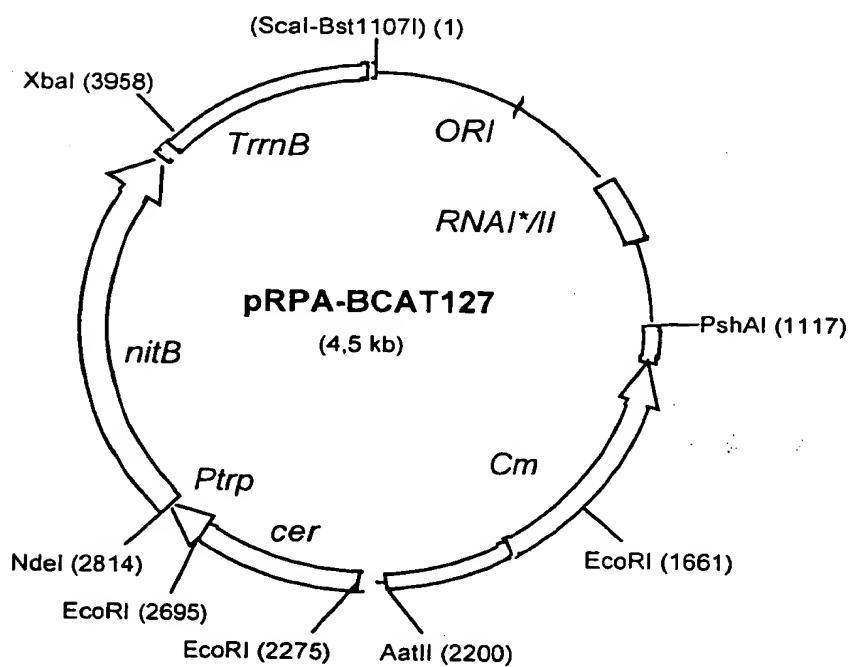
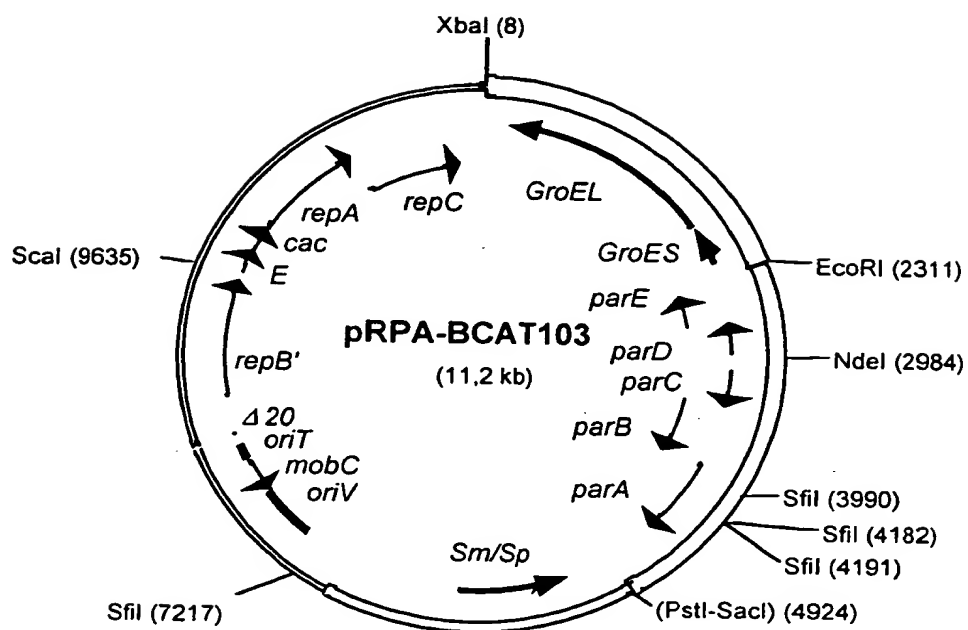


Fig. 2

**Fig. 3**



